

Hanne Tähti

Immulite 2000xPi koestus estradiolin ja FSH:n määrittämiseen ja ELISA-menetelmän testaus inhibiittori B määrittämiseen

Estradiolin ja FSH-pitoisuuden säilyvyys

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Bioanalyttikko

Bioanalytiikan ko

Opinnäytetyö

10.4.2015

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Hanne Tähti Immulite 2000xPi koestus estradiolin ja FSH:n määrittämiseen ja ELISA-menetelmän testaus inhibiini B määrittämiseen 22 sivua 10.04.2015
Tutkinto	Bioanalyttikko
Koulutusohjelma	Bioanalytiikan ko
Ohjaaja(t)	Lehtori, Hannele Pihlaja Yliopistotutkija, Eija Pöllänen
<p>Jyväskylän yliopiston Gerontologian tutkimuskeskuksessa Terveystieteiden laitoksella alkaa vuoden 2015 alussa tutkimus, jossa selvitetään vaihdevuosiin liittyvien hormonaalisten muutosten yhteyttä lihasten koossa ja toimintakyvyssä tapahtuviin ikääntymismuutoksiin. Tutkimuksen alussa naiset jaetaan neljään ryhmään tutkittavien vaihdevuosisistatusten perusteella määrittämällä seeruminäytteistä follikkelia stimuloivan hormonin (FSH) ja estradiolin pitoisuudet.</p> <p>Tässä työssä koestettiin Immulite 2000xPi analysaattorin soveltuvuus FSH:n ja estradiolin määrittämiseen ja testattiin Sigma-Aldrichin ELISA-tuotepaketin soveltuvuus inhibiini B:n määrittämiseen tulevassa tutkimusprojektissa. Lisäksi tutkittiin seeruminäytteiden estradioli- ja FSH-pitoisuuksien säilyvyyttä jääkaappisäilytyksen ja pakastuksen aikana. Lisäksi arvioitiin estradioli- ja FSH-määritysten soveltuvuutta vaihdevuosisistatusten määrittämisessä.</p> <p>Estradiolimääritysten toistettavuudet olivat vaihtelevia. Tulosten hajonta oli suurinta pienissä pitoisuuksissa ja pienintä suurissa pitoisuuksissa. FSH-määrittämisen toistettavuudessa taas ei ollut merkittäviä eroja eri pitoisuuksien välillä ja toistettavuus oli hyvä. Säilyvyystutkimusten perusteella kahden vuorokauden jääkaappisäilytyksellä ei ollut vaikutusta estradioli- eikä FSH-pitoisuuksiin. Sen sijaan kuuden viikon pakastuksen aikana estradiolipitoisuudet laskivat n. 10 % ja FSH-pitoisuudet nousivat n. 8 %. FSH-pitoisuuden nousu tosin johtui todennäköisemmin reagenssierän vaihtumisesta kuin pakastuksesta. Estradiolipitoisuus vaihteli voimakkaasti riippumatta iästä, mutta FSH-pitoisuus oli selvästi kohonnut 50- vuodesta ylöspäin. Inhibiini B määrittäminen epäonnistui.</p> <p>Immulate 2000xPi laitteisto soveltui hyvin estradiolin ja FSH:n määrittämiseen ja tulokset olivat toistettavia. Vaikka säilyvyystutkimuksissa pakastuksella näytti olevan vaikutusta erityisesti estradioliarvoihin, oli muutos niin pieni, ettei sen todettu vaikuttavan tulevassa tutkimuksessa tehtäviin johtopäätöksiin tutkitavan vaihdevuosisistatuksesta. Tutkimuksen tuloksena todettiin, että vuotopäiväkirjan, estradioli- ja FSH-määrittämisen perusteella voidaan tutkitavan vaihdevuosisistatus arvioida luotettavasti.</p>	
Avainsanat	Immulate2000xPi, estradioli, FSH, säilyvyys

Author(s) Title Number of Pages Date	Hanne Tähti Validity of Immulite 2000Xpi for FSH and Estradiol Measurements and Validity of ELISA for Inhibin B Measurement 22 pages 10.04.2015
Degree	Bachelor of Healthcare
Degree Programme	Biomedical Laboratory Science
Instructor(s)	Hannele Pihlaja, Senior Lecturer Eija Pöllänen, PhD
<p>Upcoming research project at Gerontology Research Center at University of Jyväskylä is aiming to evaluate effect of hormonal changes on muscle function during menopausal transition. In the beginning of study women are divided to four groups according to their menopausal status, by measuring serum FSH and estradiol levels.</p> <p>The purpose of this study was to evaluate validity of Immulite 2000xPi analyser for measuring estradiol and FSH levels in serum samples for upcoming research project. Also stability of estradiol and FSH levels in serum samples in various storage conditions was studied. Furthermore suitability of serum estradiol and FSH level to assess women's menopausal status was evaluated.</p> <p>Repeatability of estradiol results varied according to concentration. Variation was higher in lower concentrations and lower in higher concentrations, whereas repeatability of FSH results was constant. This indicated that Immulite 2000xPi was suitable for measuring estradiol and FSH in serum samples. As a result of storage experiments, it was shown that storing serum samples two days at 4 °C didn't affect FSH or estradiol levels, whereas estradiol level was decreased and FSH levels increased during 6 week storage at -20 °C. Although increase in FSH level was more likely due to change in reagent kit rather than storage. It was also shown that estradiol level in serum varied regardless of age, whereas FSH level was increased after 50 years of age. This indicates that with women's bleeding pattern and a knowledge of estradiol and FSH levels in serum, conclusions of menopausal stage could be made.</p>	
Keywords	Immulite 2000xPi, estradiol, FSH, storage

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Opinnäytetyön tavoitteet	1
3	Analysoitavat hormonit	3
3.1	Estradioli	3
3.2	FSH	4
3.3	Inhibiini B	5
4	Näytteiden säilyvyys	6
5	Menetelmä validointi	7
5.1	Toistettavuus	8
6	Laitteisto ja menetelmät	9
6.1	Kemiluminesenssi	9
6.1.1	Immulate 2000xPi	9
6.2	ELISA	10
6.2.1	Sigma-Aldrich inhibiini B EIA	11
7	Työn toteutus	11
7.1	Näytteet	11
7.1.1	Näytteiden käsittely	12
7.2	Immulate 2000xPi koestus	12
7.3	Näytteiden säilyvyys	13
7.4	ELISA-menetelmän testaus Inhibiini B:n määrittämiseen	13
8	Tulokset	14
8.1	Toistettavuus	14
8.1.1	Sarjan sisäinen toistettavuus	16
8.1.2	Sarjojen välinen toistettavuus	16
8.2	Säilyvyys	17
8.3	ELISA-menetelmä ja inhibiini B	19
8.4	Hormonitasot eri ikäisillä koehenkilöillä	19
9	Tulosten luotettavuus	21
10	Johtopäätökset	21

1 Johdanto

Jyväskylän yliopiston Gerontologian tutkimuskeskuksessa Terveystieteiden laitoksella alkaa vuoden 2015 alussa laaja nelivuotinen tutkimus, jossa selvitetään 48 - 54 - vuotiaiden naisten terveyttä ja toimintakykyä. Erityisesti selvitetään vaihdevuosiin liittyvien hormonaalisten muutosten, erityisesti estrogeenivajeen, yhteyttä ja vaikutuksia lihasten koossa ja toimintakyvyssä tapahtuviin ikääntymismuutoksiin. Lisäksi tutkitaan näiden muutosten taustalla olevia molekyylibiologisia mekanismeja, jotka voisivat selittää fysiologisella tasolla havaittuja muutoksia. Näitä asioita selvitetään erilaisilla fysiologisilla mittauksilla, veri- ja lihaskudosnäytteistä tehtävillä laboratoriotutkimuksilla ja tutkittavan terveydentilaa ja fyysistä aktiivisuutta selvittävillä kyselyillä. Tutkimukseen odotetaan osallistuvan n. 1100 Jyväskylän kaupungin alueella asuvaa 48 - 54 - vuotiasta naista.

Tutkimuksen alussa naiset jaetaan neljään ryhmään tutkittavien vaihdevuosistatusten perusteella. Ryhmät ovat: premenopausaaliset, aikaisessa perimenopausissa olevat, myöhäisessä perimenopausissa olevat ja postmenopausaaliset. Jaottelu on ajateltu tehtävän määrittämällä seeruminäytteistä follikkelia stimuloivan hormonin (FSH), estradiolin ja inhibiini B:n pitoisuudet sekä vuotopäiväkirjalla todetun kuukautiskierron säännöllisyyden perusteella.

Opinnäytetyössäni koestan Immulite 2000xPi analysaattorin soveltuvuuden FSH:n ja estradiolin määrittämiseen ja testaan Sigma-Aldrichin ELISA-tuotepaketin soveltuvuuden inhibiini B:n määrittämiseen tulevassa tutkimusprojektissa. Lisäksi tutkin seeruminäytteiden estradioli- ja FSH-pitoisuuksien säilyvyyttä jääkaappi säilytyksen ja pakastuksen aikana. Lisäksi arvioin estradioli, FSH ja inhibiini B määritysten soveltuvuutta vaihdevuosistatuksen määrittämisessä.

2 Opinnäytetyön tavoitteet

Yliopiston liikuntatieteiden laboratoriossa on käytössä Immulite 2000xPi analysaattori, jolla voidaan määrittää tällä hetkellä kahtatoista eri analyttia mm. insuliini, ferritiini, kortisoli ja useita hormoneja, mutta alkavaa tutkimusta varten käyttöön otetaan lisäksi

estradioli ja FSH määritykset. Vaikka laitteen valmistaja on testannut menetelmien toimivuuden, on siitä huolimatta tärkeä suorittaa laboratorion oma menetelmän käyttöönotto laboratorion omissa olosuhteissa ja omille näytteille. Koska valmistaja on jo tehnyt menetelmien validoinnit, ei laboratorion omassa menetelmän käyttöönotossa koettu tarpeelliseksi testata muita validointiin liittyviä parametreja kuin toistettavuus.

Opinnäytetyön tavoitteena oli selvittää Immulite 2000xPi analysaattorin soveltuvuutta tulevassa vaihdevuosi-ikäisten naisten terveyttä ja toimintakykyä tutkivassa tutkimusprojektissa tehtäviin estradioli ja FSH määrityksiin. Immulite 2000 xPi analysaattorin koestuksella haetaan vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

- Minkälainen on FSH ja estradioli määritysten toistettavuus?
- Soveltuuko menetelmä tulevan tutkimusprojektin näytteille?

Alkavaa tutkimusta varten käyttöön otetaan myös Sigma-Adrichin ELISA-tuotepaketti inhibiini B:n määrittystä varten. Työn tavoitteena oli testata kyseisen tuotepaketin soveltuvuutta tulevassa tutkimuksessa tehtävään inhibiini B määrittämiseen.

ELISA-tuotepaketin testauksella haetaan vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

- Millainen on menetelmän toistettavuus?
- Voidaanko kyseisellä tuotepaketilla määrittää tulevassa tutkimusprojektissa määritettäviä inhibiini B pitoisuuksia?

Tulevassa tutkimusprojektissa alun seurantanäytteitä otetaan yli tuhannelta naiselta. Päivässä näytteitä otetaan 1 - 8 naiselta, eikä ole tarkoituksen mukaista analysoida näytteitä päivittäin. Nyt halutaan selvittää voidaanko näytteet säilyttää jääkaapissa tai pakastimessa ilman, että hormonipitoisuudet muuttuvat merkittävästi. Säilyvyystestauksessa haetaan vastauksia seuraaviin kysymyksiin:

- Säilyvätkö hormonipitoisuudet alkuperäisellä tasolla jääkaappisäilytyksessä 2 vuorokauden ajan vai olisiko näytteet syytä säilyttää pakastettuina, mikäli näytteitä säilytetään pidempään?

Lisäksi halutaan varmistaa estradioli, FSH ja inhibiini B määritysten soveltuvuus vaihdevuosisäilytyksen luotettavaan määrittämiseen.

3 Analysoitavat hormonit

3.1 Estradioli

Estradioli kuuluu estrogeeneihin. Estrogeenit ovat osallisena naissukupuolen kehityksessä sikiöaikana, alkiosolujen kehityksessä sekä raskaudessa. Estrogeenit vaikuttavat myös pituuskasvuun, hermoston kehitykseen ja ovat osallisina luuston metaboliassa. (Soldina – Hoffmann – Waring – Soldina 2005.)

Tärkein estrogeeni lisääntymisikäisillä naisilla on estradioli. Sitä tuottavat keltarauhanen sekä munasarjoissa follikkelin granuloosasolut follikkelivaiheen lopussa gonadotropiinin kuten FSH:n stimuloimana. 10 % estradiolista muodostuu rasvakudoksessa androstenidionista syntyvästä estronista. Estradiolin tuotanto saa kohdun limakalvon uusiutumaan ja yhdessä progesteronin kanssa se edistää kohdun limakalvon verisuonten kasvua. Veren estradiolipitoisuus vaihtelee munasarjojen toimintakierron mukaan. Kierron alussa, sen pitoisuus on matala. Estradiolin tuotanto tehostuu follikkelivaiheessa ollen n. 110 - 440 pmol/l ja on huipussaan juuri ennen ovulaatiota (550 - 1290 pmol/l). Korkealla estradiolipitoisuudella munasarjat viestittävät aivolisäkkeelle, että follikkeli on kypsynyt valmiiksi. Ovulaation jälkeen pitoisuus laskee luteaalivaiheessa 370 - 770 pmol/l, mutta on usein kuitenkin suurempi kuin follikkelivaiheen alussa. Verenkierrossa suurin osa estradiolista on sitoutuneena kantajaproteiineihin, kuten SHBG (sex hormone binding globulin) ja albumiini. (Huslab 2014a; Ray – Kushnir – Bunker – Rockwood – Meikle 2012; Sand – Øystein – Haug – Bjålie 2012: 501-502; Tiitinen 2010.)

Menopausilla tarkoitetaan viimeisiä kuukautisia ja vaihdevuosilla (klimakterium) menopausia edeltävää ja seuraavaa ajanjaksoa. Lähestyttäessä menopausia munasarjojen toiminta alkaa heikentyä ja myös estradiolin pitoisuus pienenee. Lopulta estradiolin tuotto on niin vähäistä, että se ei enää pysty kasvattamaan kohdun limakalvoa, ja kuukautiset loppuvat (menopausi). Postmenopausaalisen naisen estradiolipitoisuus seerumissa on 0 - 130 pmol/l. (Huslab 2014a; Tiitinen 2010.)

Estradiolipitoisuutta voidaan määrittää plasmasta, seerumista, syljestä ja jopa hiuksista. Määritysmenetelmiä on useita, kuten kaasua- ja nestekromatografi-massaspektrometria ja erilaiset immunomääritysmenetelmät kuten RIA (radioim-

munoassay) ELISA (enzyme-linked immunosorbentassay), FIA (fluoroimmunoassay) ja kemiluminesenssiin perustuva CLIA (chemiluminescent immunoassay). Estradiolin immunomääritysmenetelmiin liittyy kuitenkin ongelmia kuten rajoittunut herkkyys ja risti-reaktiot. (Gaskell – Brownsey 1983; Geisler – Berntsen – Lønning 2000; Kokko – Kokko – Lövgren – Soukka 2007; Nelson – Grebe – O`Kane – Singh 2004; Silva – Lima – Schneider – Otero – Esteves 2013; Xin – Liang – Wang – Li – Lin 2008.)

Estradiolin määrittäystä käytetään selvittäessä lapsettomuuden tai kuukautisten puuttumisen syitä. Sitä käytetään myös ovulaatioinduktion seurannassa ja vaihdevuosisätiluksen määrittäksessä sekä postmenopausaalisten naisten estradiolihoidon seurannassa. Estradiolimäärittäystä voidaan myös käyttää osteoporoosiriskin selvittelyyn sekä miehillä, että naisilla. (Soldina ym. 2005; Stenman – Hämäläinen 2010).

3.2 FSH

Yksi sukupuolirauhasten hormonitoiminnan tärkeimmistä säätelijöistä sekä naisilla, että miehillä on aivolisäkkeen etulohkon gonadotroofisolujen tuottama follikkeleita stimuloiva hormoni (FSH). FSH koostuu glykolysoiduista α - ja β -ketjuista. Samanlainen α -ketju esiintyy kaikissa gonadotrofisissa hormoneissa, kuten luteinisoiva hormoni (LH) ja koriongonadotropiini ja niiden erityisominaisuudet perustuvat toisistaan eroavaan β -ketjuun (Grass – Pabst – Chang – Wozny – Altmann 2011; Sand ym. 2012: 502.)

FSH:n tehtävä naisilla on stimuloida follikkelien granuloosasoluja lisääntymään ja tuottaa estradiolia. FSH:n pitoisuus alkaa kohota muutamia päiviä ennen kuukautisvuodon alkua. Follikkeleiden kasvaessa estrogeenin, kuten estradiolin tuotanto lisääntyy ja saa FSH-pitoisuuden laskemaan negatiivisen palautevaikutuksen ansioista. FSH:n pitoisuus seerumissa on follikulaarivaiheessa 2,8 - 14,4 IU/l, ovulaatiovaiheessa 5,8 - 21 ja luteaalivaiheessa 1,2 - 9 IU/l. (Halttunen-Nieminen 2011; Sand ym. 2012: 502.)

FSH:n erityis pitoisuus alkaa lisääntyä jo lähes vuosikymmen ennen kuukautisten loppumista, vaikka kuukautiset vielä olisivatkin melko säännölliset. Estradiolipitoisuuden lasku vaikeuttaa negatiivista palautevastetta, joten FSH:n erityis pitoisuus kasvaa. FSH:n erityis pitoisuus on huipussaan 2 - 3 vuotta menopausin jälkeen, jolloin sen pitoisuus on kohonnut 21,7 - 153 IU/l. (Tiitinen 2010.)

FSH:ta voidaan määrittää sekä seerumista, että virtsasta mm. massaspektrometrillä ja useilla immunomääritysmenetelmillä (Fimlab laboratoriot Oy 2012; Huslab 2014b; Grass ym. 2011; Raiti – Johansson – Light – Migeon – Blizzard 1969; Qui – Kuo – Todd – Dias – Gould – Overstreet – Lasley 1998).

FSH:n määrittystä käytetään pääasiassa munasarjojen toiminnan selvittämiseen, mutta joskus myös hypofyyisin vajaatoiminnan selvittämiseen (Stenman – Hämäläinen 2010).

3.3 Inhibiini B

Inhibiini B on TGF- β -kasvutekijäperheeseen kuuluva glykoproteiinihormoni, joka on kahden peptidiketjun inhibiini α :n ja β :n muodostama dimeeri. Sitä erittyy munasarjojen granuloosasoluista ja sen ensisijainen tehtävä on estradiolin ohella säädellä FSH:n tuotantoa aivolisäkkeestä negatiivisen palautevasteen avulla. Toisaalta FSH säätelee granuloosolujen inhibiini B:n tuotantoa muiden hormonien ja munasarjan kasvutekijöiden kanssa. (Huhtaniemi – Tapaninen 2011; Kalra – Kumar – Patel – Patel – Khosravi 2010; Mom ym. 2007; Sand ym. 2012: 501.)

Premenopausaalisilla naisilla FSH stimuloi follikkeleiden kehitystä munasarjoissa kuukautiskierron follikulaarisessa vaiheessa. Kehittyvä follikkeli erittää inhibiini B:tä, jolloin inhibiini B:n pitoisuus nousee follikulaarivaiheen alussa. Negatiivisen palautevasteen vaikutuksesta FSH:n taso alkaa laskea. Seerumin inhibiini B taso vaihtelee kuukautiskierron mukaan 30 - 200 ng/l välillä. (Mom ym. 2007.)

Inhibiini B:n pitoisuus alkaa laskea aikaisessa perimenopausissa, kun munasarjojen follikkelimäärä pienenee, ja se onkin luotettava markkeri ennustamaan munasarjojen follikkelivarantoa. Kun inhibiini B:n pitoisuus laskee, sen aiheuttama negatiivinen palautevaikutus FSH:hon pienenee ja FSH:n erityös aivolisäkkeestä kasvaa ja jäljellä oleviin follikkeleihin kohdistuva stimulaatio voimistuu. Postmenopausissa inhibiini B:n pitoisuus laskee alle 10 ng/l. (Kalra ym. 2010; Sand ym. 2012: 501.)

Inhibiini B:tä voidaan määrittää joko plasmasta tai seerumista ELISA-menetelmällä ja sen määrittystä käytetään puberteettikehityksen ja kuukautiskierron häiriöiden sekä infertiliteetin selvittelyssä. Sitä käytetään myös kasvainmerkkiaineena munasarjan granuloosolukasvaimissa ja musinooseissa kystadenokarsinoomissa. (Fimlab laborato-

riot Oy 2013; Groome – Illingworth – O'Brien – Rodger – Mathers – McNeilly 1996; Huhtaniemi – Tapaninen 2011; Mom ym. 2007.)

4 Näytteiden säilyvyys

Virheellinen näytteen säilytys ja käsittely voivat pilata hyvin otetun näytteen. Koska aineenvaihduntareaktiot jatkuvat myös elimistön ulkopuolella, muuttuu näytteen koostumus ja yhdisteiden pitoisuudet ajan kanssa, ellei näytettä käsitellä ja säilytetä oikein. Näytteen oikeanlaisen käsittelyn ja säilytyksen tarkoituksena on siis estää näytteen kontaminoituminen ulkopuolisella materiaalilla, pysäyttää näytteessä tapahtuvat reaktiot ja saada näyte säilymään koostumukseltaan ja pitoisuudeltaan sellaisena kuin se oli näytteenottohetkellä. (Tapola 2004: 29.)

Seerumi ja plasma tulisi erottaa kokoverinäytteestä mahdollisimman pian sentrifugoimalla, sillä seerumin pitkittynyt kontakti punasolujen kanssa saattaa johtaa yhdisteiden vaihtoon seerumin ja punasolujen välillä, johtuen suurentuneeseen tai pienentyneeseen pitoisuuteen. Pitkittynyt kontakti voi myös aiheuttaa punasolujen hemolyysoitumisen, jolloin punasolujen sisältö vapautuu näytteeseen laimentaen näytettä tai lisäten tutkittavan yhdisteen pitoisuutta. Tämä on merkittävää erityisesti silloin, kun analysoidaan yhdisteen solujen sisäinen pitoisuus poikkeaa selvästi plasman tai seerumin pitoisuudesta. Hemolyysi saattaa myös häiritä tiettyjen yhdisteiden fotometrasta määrittystä. (Heins – Heil – Withold 1995; Mäkelä 2014.)

Vääränlaisen säilytyksen aikana näyte saattaa haihtua tai konsentroitua tai siihen voi tulla ulkopuolelta lisää materiaalia, joka vaikuttaa näytteen koostumukseen. Esim. bakteerikontaminaatio voi aiheuttaa näytteen mikrobiologisen hajoamisen. Muita säilytyksen aikana tapahtuvia muutoksia ovat näytteessä tapahtuvat osmoottiset prosessit sekä kaasujen diffuusio. (Mäkelä 2014).

Tutkittavan yhdisteen pitoisuus saattaa pienentyä tai lisääntyä myös entsyymaattisen hajoamisen seurauksena. Esim. proteaasit, jotka ovat plasman proteiineja hajottavia entsyymejä, alentavat hyytymistekijöiden määrää liian pitkän säilytyksen aikana. (Mäkelä 2014).

Näytteen säilytyslämpötila vaikuttaa näytteen yhdisteiden säilyvyyteen. Osa näytteistä säilyy huoneenlämmössä, mutta osa vaatii erikoisjärjestelyjä, kuten nopean jäähdytyksen tai valolta suojaamisen. Useimmat näytteet tulisi säilyttää alhaisissa lämpötiloissa, sillä huoneenlämpö aiheuttaa epävakaiden proteiinibiomarkkereiden (kuten sytokiinit), antioksidanttien (askorbiinihappo, virtsahappo) ja muiden analyyttien kuten folaatti ja vitamiini B12 hajoamisen. Huoneenlämpöä alhaisemmissa lämpötiloissa myös solut säilyvät elävinä ja alhainen lämpötila vähentää entsyymien aiheuttamaa hajoamista. Useimmat näytteet säilyvät jääkaappilämpötilassa muutamia vuorokausia ja pakastimessa viikoista useisiin kuukausiin. (Elliot – Peakman 2008; Kubasik – Ricotta – Hunter – Sine 1982; Tuokko 2010: 32.)

5 Menetelmä validointi

Mittausmenetelmän validoinnin tarkoituksena on osoittaa menetelmän olevan sopiva aiottuun käyttötarkoitukseen. Validoinnissa arvioidaan menetelmän kykyä tuottaa oikeita tuloksia niissä mittausolosuhteissa joihin se on hankittu. Menetelmien validointi käsittää mittausjärjestelyjen suunnittelun ja mittausten suorittamisen, tulosten luotettavuuden arvioinnin ja tilastolliset laskut sekä menetelmäohjeen laatimisen ja menetelmään liittyvän laadunvalvonnan suunnittelun. Validoinnin eri vaiheet, niihin liittyvät mittaukset ja johtopäätökset dokumentoidaan validointiraporttiin. Validoitavan menetelmän valinnassa otetaan huomioon analyysille asetut vaatimukset, joita ovat mm. menetelmällä määritettävät pitoisuudet ja tulosten tarkkuus, analyysin soveltuvuus erilaisille näytemateriaaleille sekä nopeus ja hinta (Hiltunen – Linko – Hemminki – Hägg – Järvenpää – Saarinen – Simonen – Kärhä 2011: 24-27; Jaarinen – Niiranen 2005: 30-35.)

Usein menetelmän tai mittalaitteen kehittäjä suorittaa validoinnin menetelmän kehitystyön aikana. Validointi tulee lisäksi suorittaa, jos menetelmää uudistetaan tai laajennetaan uusille tutkimusalueille tai menetelmässä käytetään uutta mittalaitetta. Validointi suoritetaan myös mikäli laboratorion laadunvarmistustoimenpiteet osoittavat, että menetelmässä on tapahtunut muutoksia tai menetelmää käyttää uusi analyttikko tai menetelmää käytetään toisessa laboratoriossa. Validointia käytetään myös eri mittausmenetelmien tulosten yhtäpitävyyden osoittamiseen, esimerkiksi verrattaessa uutta menetelmää ja standardimenetelmää. (Hiltunen ym. 2011: 24-27)

Se miten laaja validointi tai uusintavalidointi on tarpeen suorittaa, riippuu siitä, miten mittausmenetelmä on muuttunut olosuhdemuutosten, käyttötarkoituksen, henkilökunnan tai laitteiston johdosta. Kansainvälisten standardoitujen menetelmien validointi suoritetaan useimmiten yhteistyössä useamman laboratorion kanssa. Siitä huolimatta käyttölaboratorion tulee validoida tai tarkistaa menetelmän toimivuus laboratorion oman henkilökunnan suorittamana omilla näytteillä ja laboratorion omissa olosuhteissa sertifioidulla vertailumateriaalilla. (Hiltunen ym. 2011: 24-27.)

Validoinnissa tarkasteltavia tekijöitä ovat selektiivisyys ja spesifisyys, lineaarisuus, mittausalue, havaitsemisraja, ilmaisuraja, määritysraja, harha (bias), saanto, häiriökestävyys, toimintavarmuus, tarkkuus, uusittavuus ja toistettavuus (Hiltunen ym. 2011: 24-27).

5.1 Toistettavuus

Toistettavuudella tarkoitetaan peräkkäisten mittaustulosten yhtäpitävyyttä, kun mittaukset suoritetaan lyhyin aikavälein samoissa olosuhteissa. Käytännössä tämä tarkoittaa useita rinnakkaisia määityksiä erityyppisistä näytteistä eri pitoisuuksilla. Toistettavuutta kuvaa tuloksista laskettava variaatiokerroin (CV%), joka suhteuttaa keskihajonnan keskiarvoon, sillä keskihajonta vaihtelee aineiston keskiarvon myötä. Variaatiokerroin on keskihajonta/keskiarvo x 100. (Ehder 2005: 37; KvantiMOT 2014.)

Sarjan sisäinen toistettavuus kuvaa tulosten hajontaa yhden sarjan sisällä. Sarjassa jokainen näyte analysoidaan useana rinnakkaisena määityksenä ja jokaiselle näytteelle lasketaan variaatiokerroin. Sarjan sisäinen toistettavuus on näiden variaatiokertoimien keskiarvo. (Pharmacelsus 2014.)

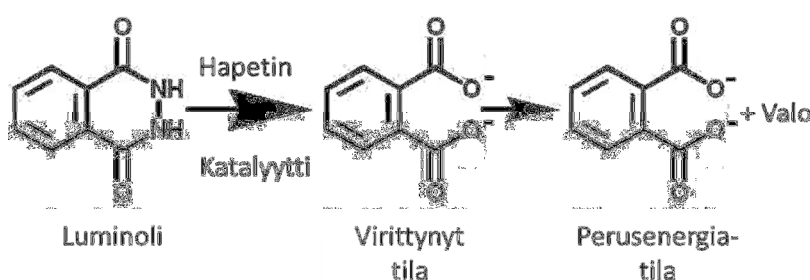
Sarjojen välinen toistettavuus kuvaa tulosten hajontaa erillisten, pitkän ajan kuluessa tehtyjen sarjojen välillä. Sarjojen välistä toistettavuutta testataan yleensä kontrollinäytteiden avulla. (Salimetrics 2015.)

Sarjojen välinen hajonta on yleensä suurempaa kuin sarjan sisäinen hajonta. Sarjojen välillä esiintyy todellista vaihtelua, jos sarjojen välinen hajonta on huomattavasti suurempaa kuin sarjan sisäinen hajonta. Tällöin syy tulee aina selvittää. Usein vaihtelu johtuu tekijöistä, jotka pysyvät sarjan sisällä muuttumattomina, kuten lämpötila, uuttoaika, säilyvyys, homogeenisuus, mutta vaihtelevat sarjojen välillä. (Ehder 2005: 37).

6 Laitteisto ja menetelmät

6.1 Kemiluminesenssi

Kemiluminesenssissa kemiallisen reaktion avulla saadaan aikaan näkyvää valoa, joka voidaan mitata ja sen määrä on verrannollinen mitattavan aineen konsentraatioon. Reaktiossa orgaaninen yhdiste (luminoli, isoluminoli, akridiumesteri, luciferin) hapettuu hapettimen avulla katalyytin läsnä ollessa. Hapettuessaan yhdiste siirtyy virittyneeseen tilaan ja perusenergiatilaan palatessaan lähettää valoa (Kuvio 1).



Kuvio 1. Kemiluminesenssin periaate (The Photochemistry Portal 2015)

Menetelmän avulla voidaan määrittää alle pikomoolin pitoisuuksia. Ilmiötä sovelletaan yleisesti hormonien, vitamiinien, proteiinien ja lääkeaineiden immunokemiallisissa määrittämissä. (Drees – Wu 2009: 140; Halonen 2004a: 76).

6.1.1 Immulite 2000xPi

Immulate 2000xPi on automaattinen immunoanalysaattori, jolla voidaan määrittää 98 erilaista analyyyttiä, kuten hormoneja, vasta-aineita ja lääkeaineita. Määrittäminen laite tekee kemiluminesenssiin perustuen. (Siemens AG 2014a; Siemens AG 2014b.)

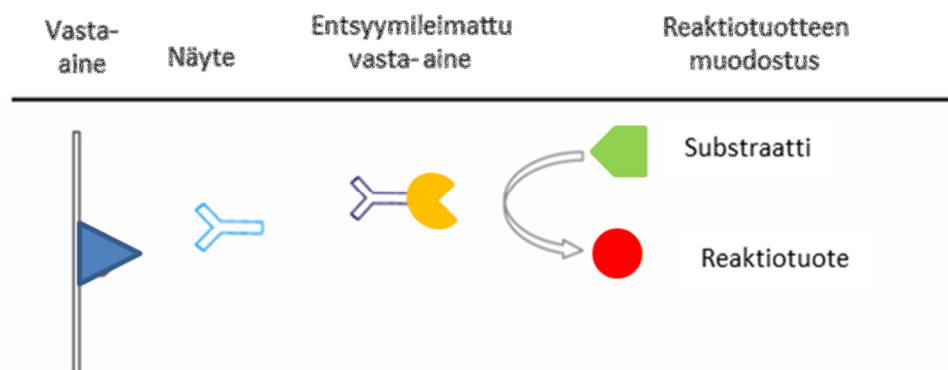
Laitteen toiminta perustuu vasta-aineella päällystettyihin polystyreenihelmiin, joihin tutkittavassa aineessa oleva antigeeni sitoutuu alkaalisen fosfaattileiman sisältävän reagenssin läsnä ollessa. Inkuboinnin jälkeen ylimääräinen reagenssi ja sitoutumaton fosfaattileima erotetaan helmestä sentrifugoinnin ja pesujen avulla. Lopuksi reaktioputkeen lisätään kemiluminentti substraatti, jonka tuottaman valon avulla sitoutuneen fosfaattileiman määrä voidaan määrittää. Valon määrä detektoidaan valomonistinputkessa. (Siemens 2010.)

Laitteella määritettävä pienin mitattava konsentraatio estradiolille on 55 pmol/l ja FSH:lle 0,1 IU/l. Näytteen lipeemisyys ja yli 200 mg/l:n bilirubiinipitoisuus saattavat häiritä estradiolimääritystä, mutta FSH määrittelyyn niillä ei ole vaikutusta. Näytteen hemolyysi ei häiritse kumpaakaan määrittystä. (Siemens 2013a; Siemens 2013b.)

6.2 ELISA

Yleinen kliinisessä kemiassa käytetty EIA-menetelmä (enzyme immunoassay) on heterogeeninen kaksois-vasta-ainetekniikkaan perustuva ELISA-menetelmä. Menetelmä voidaan jakaa kolmeen eri tyyppiin: suora, epäsuora ja sandwich. Nämä voidaan vielä jaotella kilpaileviin ja inhiboiviin menetelmiin. (Crowther 2009: 11.)

ELISA-menetelmässä kiinteän faasin, esimerkiksi kuoppalevyn pohjaan on sidottu yksi reaktioon osallistuvista komponenteista, joka usein on vasta-aine. Kun näyte annostellaan kuoppalevyyn, mitattava yhdiste sitoutuu kiinteässä faasissa olevaan komponenttiin. Tämän jälkeen kiinteä faasi pestään, ja kuoppalevylle lisätään entsyymileimattu reagenssi (usein entsyymileimattu vasta-aine), jolloin muodostuu kiinteään faasiin sidottu kompleksi. Tämän jälkeen ylimääräinen sitoutumaton reagenssi pestään pois ja lisätään substraatti, jolloin entsyymi katalysoi substraatin reaktiotuotteeksi, joka mitataan (Kuvio 2). Syntyneen reaktiotuotteen määrä on suoraan verrannollinen näytteessä olevaan mitattavaan yhdisteeseen. Tyypillisiä ELISA-menetelmässä käytettyjä entsyymejä ovat alkaalinen fosfataasi, beeta-galaktosidaasi ja peroksidaasi (Halonen 2004b: 94-95; Åkerman 2010: 84.)



Kuvio 2. ELISA-menetelmän periaate (Halonen 2004b: 94-95; Åkerman 2010: 84).

Immunomääritysmenetelmiin, kuten ELISA:an liittyy myös ongelmia. Yleisin menetelmään häiriötä aiheuttava tekijä ovat ristireaktiot. Mikäli näytteessä on jokin yhdiste, jonka antigeenin rakenne muistuttaa määritettävän yhdisteen antigeenin rakennetta, saattaa vasta-aine sitoutua väärään yhdisteeseen, jolloin tulosten tulkinta vaikeutuu. Ristireaktiot ovat yleinen ongelma erityisesti hormonimäärityksissä. (Schiettecatte – Anckaert – Smitz 2012: 47.)

6.2.1 Sigma-Aldrich inhibiini B EIA

Sigma-Aldrichin inhibiini B EIA tuotepaketti on *in vitro* kvantitatiivinen kilpaileva ELISA-menetelmä inhibiini B:n β -peptidin määrittämiseen. Paketin mukana tuleva kuoppalevy on päällystetty anti-rabbit sekundäärisellä vasta-aineella. Epäspesifien sitoutumispaikkojen täyttämisen ja anti-inhibiini B vasta-aineinkubaation jälkeen biotinyloitu inhibiini B peptidi ja näytteessä oleva peptidi kilpailevat inhibiini B:n vasta-aineeseen sitoutumisesta. Tämän jälkeen sitoutunut biotinyloitu inhibiini B peptidi reagoi Streptavidini-piparjuuriperoksidaasi:n kanssa, joka katalysoi värinkehittymisreaktion. Värin intensiteetti on suoraan verrannollinen biotinyloidun peptidi-streptavidini-piparjuuriperoksidaasikompleksin määrään ja kääntäen verrannollinen näytteessä olevaan inhibiini B:n β -peptidin määrään. Standardipitoisuuksien avulla luodaan standardikäyrä, jonka avulla näytteessä olevan inhibiini B β -peptidin pitoisuus voidaan laskea. (Sigma-Aldrich 2014.)

Kyseessä oleva menetelmä mittaa inhibiini B:n β -peptidiketjun määrää näytteessä ja siksi on teoriassa mahdollista, että testin avulla havaitaan inhibiini B:n lisäksi myös näytteessä olevat aktiiviini B ja aktiiviini AB, jotka myös sisältävät β -peptidiketjun. (Sigma-Aldrich 2014.)

7 Työn toteutus

7.1 Näytteet

Immulate 2000xPi analysaattorin koetuksessa, säilyvyyskokeissa ja ELISA-menetelmän testauksessa näytteinä käytettiin yliopiston henkilökunnalta kerättyjä seeruminäytteitä. Näytteet otettiin 14:sta 32 - 64-vuotiaalta naiselta. Lisäksi otettiin näyte miespuoliselta koehenkilöltä, jotta saatiin varmistettua vähintään yksi alhainen estera-

diolitulos. Koska näytteet otettiin vapaaehtoisilta henkilökunnan edustajilta, ei näytteitä ollut mahdollista saada enempää.

Kontrollinäytteinä olivat kaupallinen Seronorm immunoassay ja yliopiston oma seerumipoolinäyte. Seronorm on kaupallinen Seron valmistama ihmispohjainen kontrollivalmiste immunokemiallisiin analyyseihin (SERO 2015). Seronorm toimi tutkimuksissa estradiolin ja FSH:n mittausten korkeana kontrollina. Seerumipoolinäyte oli yliopiston itse valmistama usealta eri henkilöltä kerätyistä seeruminäytteistä valmistettu kontrolli. Seerumipoolinäyte toimi tutkimuksessa matalana kontrollina.

7.1.1 Näytteiden käsittely

Näytteenoton jälkeen seeruminäytteiden annettiin seistä 10 minuuttia (tai kunnes näyte oli hyytynyt), jonka jälkeen ne sentrifugoitiin 3000 rpm 10 min. Osa seerumista käytettiin analyyseihin heti ja loput säilytettiin jääkaapissa (+ 4 °C) 2 vrk:ta tai pakastimessa (-20 °C) 6 viikkoa.

7.2 Immulite 2000xPi koestus

Toistettavuutta määritettiin tekemällä neljästätoista eritasoisesta tutkimusnäytteestä sekä kahdesta eritasoisesta standardinäytteestä kolme rinnakkaista määritystä. Jokaisesta näytteestä laskettiin variaatiokerroin. Sarjan sisäinen toistettavuus oli näiden variaatiokertoimien keskiarvo. Lisäksi sarjan sisäistä toistettavuutta määritettiin tekemällä kahdella eritasoisella standardinäytteellä 10 toistomittausta kahtena peräkkäisenä päivänä. Myös näistä laskettiin variaatiokerroin.

Toistettavuutta tutkittiin myös eri pitoisuuksilla jakamalla tulokset pitoisuuden perusteella neljään ryhmään. Jokaiselle pitoisuusryhmälle laskettiin kaikkien kolmen päivän variaatiokertoimista keskiarvo.

Sarjojen välistä toistettavuus määritettiin tekemällä kahdella eritasoisella standardinäytteellä toistomittauksia kuutena päivänä.

7.3 Näytteiden säilyvyys

Näytteiden säilyvyyttä tutkittiin analysoimalla samat näytteet kolmena peräkkäisenä päivänä. Näytteet säilytettiin välissä jääkaapissa (+ 4 °C). Lisäksi tutkittiin pakastamisen ja sulatus-pakastus-sulatus –syklin vaikutusta näytteeseen analysoimalla 6 viikkoa pakastimessa (-20 °C) säilytetyt näytteet ja pakastamalla näytteet uudestaan ja analysoimalla ne vielä kerran.

Säilyvyytulokset analysoitiin käyttäen tilastollista Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testiä. Tätä testiä voidaan käyttää kahden toisistaan riippuvan otoksen vertailuun. Wilcoxon testi tutkii eroja parien sisällä ja parien välillä. Tätä testiä voidaan käyttää, jos otoskoko on alle 30, ja ei ole varmuutta ovatko tarkasteltavat muuttujat normaalijakautuneita. Testillä verrattiin tuorenäytteen (0 h) FSH- ja estradiolipitoisuuksia yhden ja kahden vuorokauden (24h ja 48 h) jääkaappisäilytyksen jälkeisiin FSH- ja estradiolipitoisuuksiin seerumissa, sekä tuorenäytteen FSH- ja estradiolipitoisuuksia kuuden viikon pakastuksen jälkeisiin ja sulatus-pakastus-sulatus –syklin jälkeisiin pitoisuuksiin. Mikäli p-arvo oli pienempi kuin 0,05 oli pitoisuus muuttunut säilytyksen aikana.

Lisäksi jokaiselle näytteelle laskettiin keskiarvo kahden vuorokauden jääkaappisäilytyksen ajalta ($\bar{X}_{\text{jääkaappi}} = (\bar{X}_{0h} + \bar{X}_{24h} + \bar{X}_{48h})/3$) sekä keskiarvo pakastuksen ajalta ($\bar{X}_{\text{pakastus}} = (\bar{X}_{6\text{viikkoa}} + \bar{X}_{\text{uudelleenpakastus}})/2$).

7.4 ELISA-menetelmän testaus Inhibiini B:n määrittämiseen

Inhibiini B:n määrittämistä varten testattava tuotepaketti oli Sigma-Aldrichin Inhibin B EIA. Näytteinä käytettiin yliopiston henkilökunnalta aikaisemmin kerättyjä ja pakastettuja seeruminäytteitä. Lisäksi kahdelta henkilöltä otettiin vertailuksi tuoreet näytteet, jotta voitiin arvioida säilytyksen mahdollista vaikutusta näytteisiin. Jokaisesta näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista toistomittaus.

8 Tulokset

8.1 Toistettavuus

Taulukossa 1. on esitetty estradiolimäärityksistä jokaisen näytteen keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin heti näytteenoton jälkeen (0 h), sekä yhden (24 h), että kahden vuorokauden (48 h) jääkaapissa säilytyksen jälkeen. Taulukosta nähdään, että estradiolimäärityksen toistettavuudessa oli suurta vaihtelua ja yksittäisen näytteen variaatiokerroin vaihteli 0 - 36 % välillä.

Taulukko 1. Estradiolitulosten keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet.

0 h			24 h			48 h		
\bar{X}	s	CV%	\bar{X}	s	CV%	\bar{X} (*)	s	CV%
165,3	28,7	17,4	134,0	25,2	18,8	147,5	4,9	3,4
667,0	34,1	5,1	658,3	13,1	2,0	701,0	0,0	0,0
148,0	32,6	22,0	164,0	14,7	9,0	156,5	4,9	3,2
833,3	41,0	4,9	884,7	45,8	5,2	835,0	18,4	2,2
741,3	44,5	6,0	766,0	33,0	4,3	771,0	31,1	4,0
115,3	8,1	7,1	127,3	9,5	7,4	124,0	4,2	3,4
116,7	15,2	13,0	160,3	14,0	8,7	135,0	5,7	4,2
503,0	24,2	4,8	509,0	14,0	2,8	519,5	64,3	12,4
214,3	76,5	35,7	305,7	17,8	5,8	189,5	3,5	1,9
285,3	15,3	5,4	183,0	11,1	6,1	185,5	16,3	8,8
361,3	11,2	3,1	304,3	14,6	4,8	298,5	24,7	8,3
744,0	58,7	7,9	799,0	42,6	5,3	818,5	57,3	7,0
287,0	23,6	8,2	287,0	8,5	3,0	315,0	14,1	4,5
150,3	30,1	20,0	173,0	16,5	9,5	-	-	-

*)Keskiarvo kahdesta rinnakkaisesta määrittäyksestä

Variaatio oli keskimäärin suurempaa pienillä pitoisuuksilla ja pieneni suurempiin pitoisuuksiin mentäessä. Alle 200 pmol/l pitoisuuksissa yksittäisen näytteen variaatiokerroin vaihteli 1,9 %:sta 37,1 %:iin ollen keskimäärin 11,2 % (Taulukko 2). Pienintä hajonta oli yli 600 pmol/l pitoisuuksissa, jolloin yksittäisen näytteen variaatiokerroin vaihteli 0 - 7,9 % välillä. Laitevalmistajan ilmoittama variaatiokerroin eri pitoisuuksille oli 7,1 - 16 % (Siemens 2013a). Tulokset vastasivat laitevalmistajan tuloksia.

Taulukko 2. Estradioli määrittelyn toistettavuus eri pitoisuuksilla

Pitoisuus (pmol/l)	CV%
<200	11,2
200-350	9,5
350-600	5,8
600 <	4,7

Taulukossa 3. on esitetty FSH-määrittelyistä jokaisen näytteen keskiarvo, keskihajonta ja variaatiokerroin heti näytteenoton jälkeen, sekä yhden, että kahden vuorokauden jääkaapissa säilytyksen jälkeen. Taulukosta nähdään, että FSH-määrittelyn toistettavuus oli hyvä ja yksittäisen näytteen variaatiokerroin vaihteli 1,1 - 9,4 % välillä.

Taulukko 3. FSH-tulosten keskiarvot, keskihajonnat ja variaatiokertoimet

0 h			24 h			48 h
\bar{X}	s	CV%	\bar{X}	s	CV%	X^t
94,6	3,1	3,31	92,0	2,8	3,0	83,9
37,4	2,5	6,56	39,5	0,3	0,6	38,2
6,6	0,1	2,24	6,5	0,3	5,3	6,17
7,7	0,3	3,63	7,2	0,7	9,4	7,35
3,9	0,2	5,15	4,0	0,0	1,1	4,04
4,7	0,1	1,27	4,6	0,1	1,6	4,35
6,3	0,1	1,2	6,3	0,2	3,0	5,97
4,9	0,3	5,69	4,9	0,3	5,6	5,19
5,9	0,5	7,73	6,1	0,3	4,6	6,41
65,1	1,6	2,39	64,5	1,7	2,7	58,2
5,2	0,1	0,97	5,2	0,2	4,6	5,11
1,9	0,02	1,06	2,0	0,1	2,6	1,76
5,3	0,3	6,51	5,4	0,1	1,3	4,83
76,3	2,8	3,62	79,6	1,5	1,9	75,2

*)Tuloksista ei ole rinnakkaisia määrittelyksiä

FSH-määrittelyn toistettavuudessa ei ollut merkittäviä eroja myöskään eri pitoisuuksien välillä. Variaatiokerroin oli eri pitoisuuksilla 3,0 - 4,2 % (Taulukko 4).

Taulukko 4. FSH-määrityksen toistettavuus eri pitoisuuksilla

Pitoisuus (IU/l)	CV%
<5	3,0
5-10	4,2
>30	3,1

8.1.1 Sarjan sisäinen toistettavuus

Estradiolimääritysten sarjojen sisäiset toistettavuudet olivat myös vaihtelevia. Variaatiokerroin oli 4,3 - 12,7 % (Taulukko 5). Ensimmäisessä mittaussarjassa kolmessa näytteessä yksi kolmesta rinnakkaisesta tuloksesta poikkesi huomattavasti muista. Jos nämä kolme poikkeavat tulokset jätettiin pois, ensimmäisen sarjan variaatiokerroin laski 9,2 %. Seerumipoolinäytettä käytettäessä sarjan sisäinen toistettavuus oli huono. Variaatiokerroin oli n. 17 % molemmilla mittauserroilla. Tämä ylitti laitevalmistajan määrittämät arvot, joskin joissain tapauksissa jopa 25 % variaatiokerrointa voidaan vielä pitää hyväksyttävänä (Findlay – Smith – Lee – Nordblum – Das – DeSilva – Khan – Bowsher 2000; Murray – Peter – Teclaw 1993).

FSH-määrityksissä sarjan sisäinen toistettavuus oli kaikissa mittaussarjoissa hyvä. Variaatiokerroin oli 2,2 - 3,7 % (Taulukko 5). Tulokset vastasivat hyvin laitevalmistajan arvoja.

Taulukko 5. Sarjojen sisäiset toistettavuudet

	Näytteet 0 h	Näytteet 24 h	Näytteet 48 h	SP ^{1,2} 1. päivä	SP ^{1,2} 2. päivä	Seronorm 1. päivä	Seronorm 2. päivä
E2 ¹ (CV%)	12,7	6,9	4,9	16,7	17,0	5,0	4,3
FSH (CV%)	3,4	3,7	-	2,5	2,2	2,4	3,2

1) Estradioli 2) Seerumipooli

8.1.2 Sarjojen välinen toistettavuus

Sarjojen välinen toistettavuus oli hyvä sekä matalilla, että korkeilla arvoilla (Taulukko 6). Matalana kontrollina toimi seerumipoolinäyte ja korkeana kontrollina kaupallinen

Seronorm. Sekä estradiolin että FSH:n toistettavuus vastasivat laitevalmistajan antamia tuloksia.

Taulukko 6. Sarjojen välinen toistettavuus

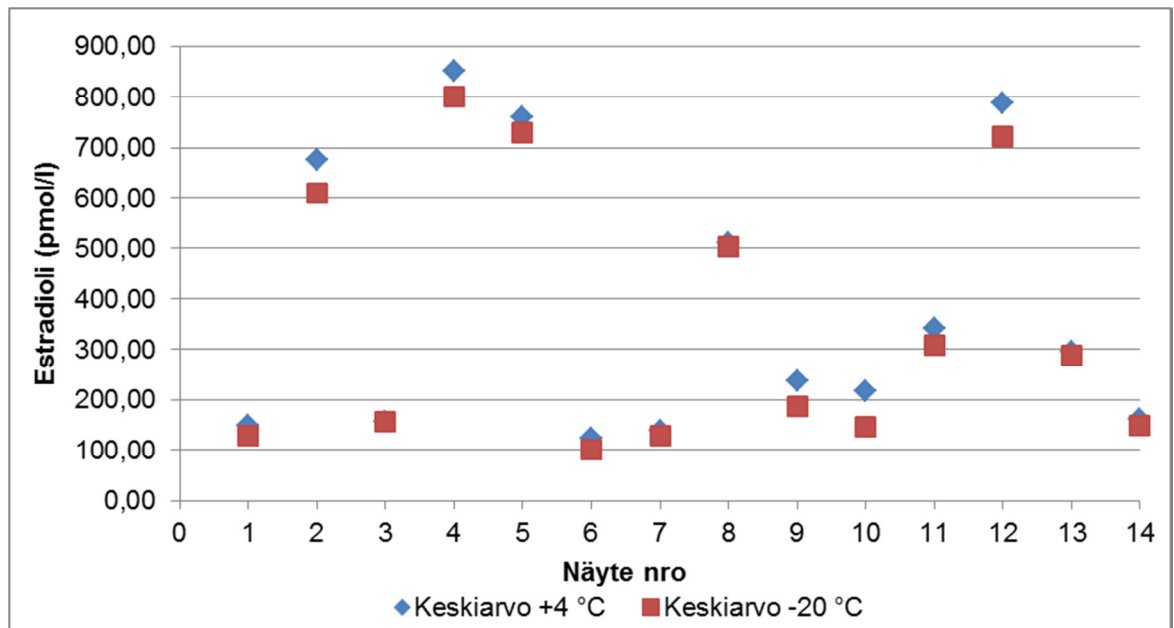
	Estradioli (pmol/l)		FSH (IU/l)	
	Seerumipooli	Seronorm	Seerumipooli	Seronorm
Tavoitearvo	-	570 - 890	-	30,6 - 51,1
Keskiarvo	86,9	799,4	5,83	37,4
Keskihajonta	13,7	16,0	0,12	1,9
CV%	15,8	2,0	2,02	5,09

Koska Seronorm on kaupallinen kontrolli, oli sille valmistajan antamat tavoitearvot. Tulokset vastasivat myös näitä arvoja.

8.2 Säilyvyys

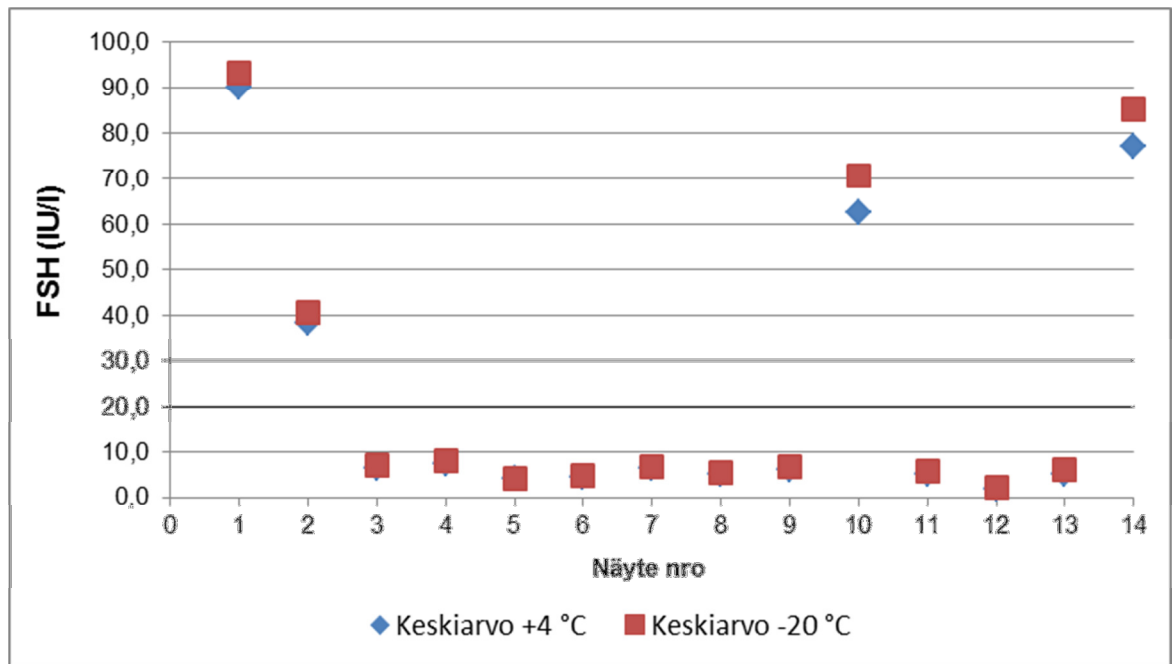
Tulokset laskettiin käyttäen tilastollista Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testiä. Verrattaessa tuorenäytteiden pitoisuuksia (0 h) yhden vuorokauden jääkaappisäilytyksen jälkeisiin pitoisuuksiin (24 h) oli p-arvo estradiolille 0,382 ja FSH:lle 0,875. Kun taas verrattiin tuorenäytteen pitoisuuksia kahden vuorokauden jääkaappisäilytyksen jälkeisiin pitoisuuksiin, oli p-arvo estradiolille 0,239 ja FSH:lle 0,124. Testin perusteella kahden jääkaappisäilytyksellä ei siis ollut merkitystä estradioli eikä FSH-pitoisuuksiin.

Estradiolin säilyvyystulokset olivat pakastuksen kohdalta ristiriitaiset. Testin mukaan 6 viikon pakastuksella oli vaikutusta, kun verrattiin tuorenäytteiden (0 h) estradiolipitoisuuksia kuuden viikon pakastuksen jälkeisiin pitoisuuksiin (p-arvo 0,005). Mutta, kun verrattiin tuorenäytteiden pitoisuuksia sulatus-pakastus-sulatus -syklin jälkeisiin pitoisuuksiin, ei merkitystä enää ollut (p-arvo 0,158). Myöskään verrattaessa pakastettuja ja uudelleen pakastettuja näytteitä (sulatus-pakastus-sulatus syklin läpikäyneet näytteet), ei sulatus-pakastus-sulatus -syklillä ollut vaikutusta estradiolipitoisuuksiin (p-arvo 0,124). Kuitenkin, jos verrattiin jääkaapissa säilytettyjen keskiarvoja pakasteessa olleisiin, olivat pitoisuudet laskeneet keskimäärin 10 % pakastuksen aikana (Kuvio 3).



Kuvio 3. Estradiolin pitoisuus jääkaappisäilytyksen ja pakastuksen jälkeen.

Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testin perusteella pakastuksella oli vaikutusta FSH-pitoisuuksiin. Kun verrattiin tuorenäytteiden (0 h) pitoisuuksia 6 viikon pakastuksen jälkeisiin pitoisuuksiin oli p-arvo 0,041 ja kun verrattiin tuorenäytteiden pitoisuuksia sulatus-pakastus-sulatus -syklin jälkeisiin pitoisuuksiin, oli p-arvo 0,001. Pakastuksen jälkeen pitoisuudet olivat keskimäärin 8 % suurempia, kun verrattiin jääkaapissa säilytettyjen keskiarvoja pakastuksen jälkeisiin keskiarvoihin (Kuvio 4). Nousu johtui kuitenkin todennäköisemmin reagenssipakkauksen erän vaihtumisesta kuin pakastuksesta. Muissakaan säilyvyystutkimuksissa FSH pitoisuuden ei ole todettu nousevan pakastuksen aikana vaan pysyvän vakaana tai laskevan, eikä seerumin hormonien ole todettu olevan herkkiä säilytykselle. Estradioli- ja FSH-pitoisuuksien on todettu pysyvän vakaina jopa 72 h huoneenlämmössä säilytyksen aikana ja eräässä tutkimuksessa vasta 2-3 vuotta kestäneen pakastuksen aikana FSH pitoisuus oli laskenut 23 %. (Gislefoss – Grimsrud - Mørkrid 2014; Scriver – Baker – Young – Behr – Pastore 2010; Taieb – Benattar – Birr – Lindenbaum – Frydman – Olivennes 2000).



Kuvio 4. FSH:n pitoisuus jääkaappisäilytyksen ja pakastuksen jälkeen.

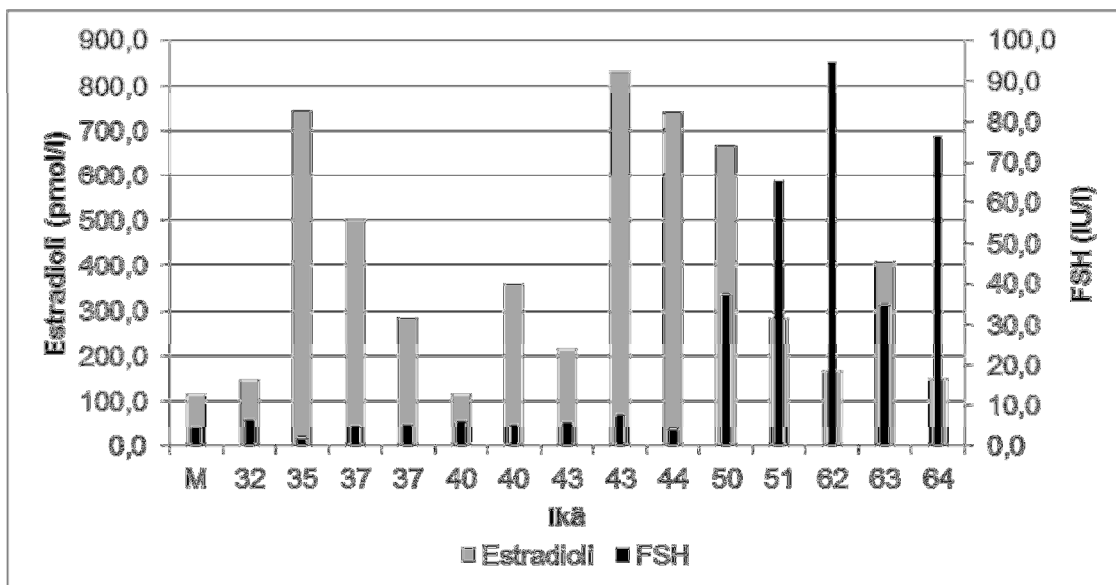
Sulatus-pakastus-sulatus -syklillä ei todettu olevan vaikutusta FSH-pitoisuuksiin (p-arvo 0,422).

8.3 ELISA-menetelmä ja inhibiini B

Inhibiini B-määritys epäonnistui. Sigma-Aldrichin ELISA tuotepaketti oli vaikeakäyttöinen ja menetelmäohjeet eivät olleet aina yksiselitteisiä. Esimerkiksi reagenssit oli nimetty epäloogisesti. Kyseinen ELISA menetelmä sisälsi useita vaiheita ja hyvin pienten reagenssimäärien pipetointia. Todennäköisesti jossain kohdassa on sattunut virhe, jonka seurauksena tuloksia ei saatu.

8.4 Hormonitasot eri ikäisillä koehenkilöillä

Estradiolipitoisuus vaihteli voimakkaasti riippumatta iästä (Kuvio 3). 30 - 40 -vuotiaiden ryhmässä estradiolipitoisuus oli 148 - 744 pmol/l, 40 - 50 -vuotiailla 117 - 833 pmol/l, 50 - 60 -vuotiailla 285 - 667 pmol/l ja yli 60-vuotiailla 150 - 165 pmol/l. FSH-pitoisuus oli selvästi kohonnut 50 vuodesta ylöspäin. Yli 50-vuotiailla pitoisuus oli 37,4 - 94,6 IU/l, kun taas alle 50-vuotiailla pitoisuus oli 1,9 - 7,7 IU/l. FSH-pitoisuus kohoaaakin lähestyttäessä vaihdevuosisia ja on huipussaan 2-3 vuotta menopaussin jälkeen (Tiitinen 2010).



M=mies

Kuvio 3. Hormonitasot eri ikäryhmissä.

Pelkän estradiolipitoisuuden perusteella vaihdevuosistatusta on vaikea määrittää, sillä estradiolipitoisuus veressä vaihtelee premenopausaalisilla naisilla voimakkaasti kuukautiskierron mukaan 110 - 1290 pmol/l välillä. Postmenopausaalisilla naisilla seerumin estradiolipitoisuus putoaa 0 - 130 pmol/l:ssa. (Huslab 2014a.)

Myöskään pelkän FSH-pitoisuuden perusteella ei vaihdevuosistatusta voida määrittää. Aikaisessa perimenopausissa munasarjojen follikkelimäärän pienentyessä FSH:n erityis alkaa kasvaa, mutta toisaalta myös estradiolin tuotanto voi olla vielä korkea estäen FSH:n nousun. Tällöin FSH:n pitoisuus ei kuvaa munasarjojen todellista jäljellä olevaa follikkelimäärää, eikä näin ollen myöskään vaihdevuosistatusta. Lisäksi FSH:n erityis kuukautiskierron aikaisessa follikulaarisessa vaiheessa on jaksottaista, joten premenopausaalisilla naisilla tarvitaan useita mittauksia luotettavan tuloksen saamiseksi. Sen sijaan postmenopausaalisilla naisilla jo yksi mittaus kertoo luotettavasti seerumin FSH-tason ja vaihdevuosien voidaan todeta alkaneeksi, kun FSH-arvo on yli 30 IU/l. (Arslan – Zeleniuch–Jacquotte – Lukanova – Rinaldi – Kaaks – Toniolo 2003; Butlera – Santoro 2011; Stenman – Hämäläinen 2010.)

Vaihdevuosistatuksen määrittämiseen estradiolin ja FSH:n määrittystä tulisivin käyttää aina yhdessä. Usein statuksen määrittämiseen käytetään lisäksi vuotopäiväkirjaa joko yksin tai yhdessä hormonimääritysten kanssa. (Brambilla – Mckinlay – Johannes 1994; Butlera – Santoro 2011.)

9 Tulosten luotettavuus

Laskimoverinäytteet otettiin ottaen huomioon preanalyttiset tekijät ja näytteet otettiin aseptisesti. Myös näytteiden esikäsittely tehtiin suositusten mukaisesti, joten näytteet täyttävät niille asetetut laatuvaatimukset.

Mittaukset suoritettiin Immulite2000xPi laitteella, joka oli asianmukaisesti huollettu laboratoriohenkilökunnan toimesta. Käytettyjen reagenssierien päiväykset olivat voimassa ja laite oli adjustoitu kyseisille reagenssierille.

Sain laitteen käyttöön hyvän perehdytyksen ja tutustuin laitteen toimintaperiaatteeseen ja käyttöohjeisiin, ennen näytteiden analysointia.

Analysoitujen näytteiden määrä oli pieni ja erityisesti säilyvyystutkimukset olisivat olleet luotettavampia suuremmalla näytemäärällä. Vaikka näytteiden määrä oli pieni, tehtiin jokaisesta näytteestä kolme rinnakkaista määritystä, joka lisäsi tulosten luotettavuutta. Lisäksi kontrollinäytteillä tehtiin yhteensä 46 toistoa useana päivänä ja kontrollit määritettiin myös jokaisen näytesarjan yhteydessä.

10 Johtopäätökset

Immulite 2000xPi laitteisto soveltui hyvin estradiolin ja FSH:n määrittäisiin. Tulokset olivat toistettavia ja vastasivat valmistajan tuloksia, vaikka estradiolin kohdalla tuloksissa olikin suurempaa hajontaa erityisesti pienillä pitoisuuksilla. Vaikka, pienillä pitoisuuksilla estradiolitulosten hajonta oli joidenkin näytteiden kohdalla suurta (CV% 37), riittää tulosten tarkkuus kuitenkin estradiolitason määrittämiseen tulevassa tutkimuksessa, sillä tarkalla tuloksella ei ole merkitystä johtopäätösten tekemiseen tutkittavan vaihdevuosistatuksesta.

Estradiolin ja FSH:n pitoisuudet säilyivät hyvin kahden vuorokauden jääkaappisäilytyksessä, mutta estradiolin kohdalla pakastuksen vaikutukset olivat ristiriitaiset. Sekä Wilcoxon merkittyjen sijalukujen testi, että jääkaappisäilytyksen aikaisten ja pakastuksen aikaisten keskiarvojen vertaaminen osoittivat, että pakastuksen vaikuttaneen hormonipitoisuuksiin, joskin FSH:n pitoisuuksien muutokset johtuivat todennäköisemmin reagenssierän vaihtumisesta kuin pakastuksesta. Myös aineiston pieni otoskoko vaikut-

ti tulosten ristiriitaisuuteen ja suuremmalla aineistolla tulokset olisivat todennäköisesti olleet yhdenmukaisemmat. Vaikka pakastuksella näytti olevan vaikutusta erityisesti estradioliarvoihin, oli muutos niin pieni, että se ei vaikuta johtopäätöksiin tutkittavan vaihdevuosistatuksesta. Lisäksi laitevalmistaja on antanut omat suosituksensa FSH- ja estradiolinäytteiden säilytykseen. Laitevalmistajan suositusten mukaan FSH:n määrittystä varten seeruminäytettä voitaisiin säilyttää 7 päivää jääkaappilämpötilassa, mutta estradiolinäytteet säilyvät valmistajan mukaan vain 2 päivää jääkaappilämpötilassa. Sen sijaan sekä estradioli-, että FSH-näytteitä voidaan säilyttää pakastimessa 2 kuukautta. Tulevassa tutkimuksessa näytteet tullessaan analysoimaan kerran viikossa, joten säilytys tapahtuu pakastimessa -20 °C.

Mikäli näytteitä jouduttaisiin pakastamaan uudestaan, esim. laiterikon sattuessa, ei yhden kerran toistetulla sulatus-pakastus-sulatus –syklillä todettu olevan vaikutusta näytteiden hormonipitoisuuksiin.

Estradiolipitoisuus vaihteli riippumatta tutkittavan iästä. Vaihtelua selittää lisääntymisikäisillä kuukatiskierto ja postmenopausaalisilla korkeita arvoja voivat selittää mm. hormonikierukan käyttö. FSH-arvot sen sijaan olivat selvästi kohonneet yli 50-vuotiaiden ryhmässä. Pelkän estradioli- tai FSH-määrittelyn perusteella ei vaihdevuosistatusta voida määrittää, mutta määrittämällä molempien hormonien pitoisuudet ja tutkittavan vuotopäiväkirjan perusteella voidaan vaihdevuosistatus arvioida luotettavasti.

Inhibiini B:n analyysi epäonnistui ja tuloksia ei saatu. Tulevassa ERMA tutkimuksessa inhibiini B-määritykset oli tarkoitus tehdä 1.- 5. vuotopäivänä, mikäli tutkittavalla vuotoja vielä on. Tällöin inhibiini B pitoisuus on n. 30 - 90 ng/l. Mikäli tutkittava on postmenopausaalinen voi inhibiini B pitoisuus olla jopa alle 10 ng/l. Kyseisen ELISA tuotepaketin määritysraja oli 34,6 ng/l (Sigma-Aldrich 2014), jolloin on hyvin todennäköistä, että inhibiini B:tä ei suurimmalta osalta tutkittavia olisi voitu kyseisellä tuotepaketilla edes määrittää, joten tulevassa tutkimuksessa inhibiini B määrittystä ei tulla käyttämään.

Lähteet

Arslan, Alan – Zeleniuch – Jacquotte, Anne – Lukanova, Annekatrin – Rinaldi, Sabina – Kaaks, Rudolf – Toniolo, Paolo 2003. Reliability of follicle-stimulating hormone measurements in serum. *Reproductive Biology and Endocrinology* 1. 49.

Brambilla, Donald – Mckinlay, Sonja – Johannes, Catherine 1994. Defining the perimenopause for application in epidemiologic investigation. *American Journal of Epidemiology* 140(12). 1091-1095.

Butlera, Laura – Santoro, Nanette 2011. The reproductive endocrinology of the menopausal transition. *Steroids* 76(7). 627–635.

Crowther, John 2011. *The ELISA Guidebook*. 1. painos. Totowa: Humana press.

Drees, Julia – Wu, Alan 2009. *Analytical Techniques*. Teoksessa Bishop, Michael – Fody, Edward – Schoeff, Larry: *Clinical Chemistry, techniques, principles, correlations*. 6. painos. Lippincott Williams & Wilkins.

Ehder, Tapio (toim.) 2005. *Kemian metrologian opas*. Finas. Metrologian neuvottelukunta. Verkkodokumentti.
<http://www.mikes.fi/documents/upload/j6_05_b5_nettiin.pdf>. Luettu 19.9.2014

Elliot, Paul – Peakman, Tim 2008. The UK biobank sample handling and storage protocol for the collection, processing and archiving of human blood and urine. *The International Journal of Epidemiology* 37(2). 234-244.

Fimlab laboratoriot Oy 2012. Follikkelia stimuloiva hormoni. Tutkimusohjekirja.

Fimlab laboratoriot Oy 2013. Inhibiini B. Tutkimusohjekirja.

Findlay, J – Smith, W – Lee, J – Nordblum, G – Das, I – DeSilva, B – Khan, M – Bowsher, R. 2000. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 21(6). 1249-1273.

Gaskell, Simon – Brownsey, Brian 1983. Immunoabsorption to improve gas chromatography/high-resolution mass spectrometry of estradiol-17 β in plasma. *Clinical Chemistry* 29(4). 677-680.

Geisler, Jurgen – Berntsen, Hildegunn – Lønning, Per 2000. A novel HPLC-RIA method for the simultaneous detection of estrone, estradiol and estrone sulphate levels in breast cancer tissue. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 72(5). 259-264.

Gislefoss, Randi – Grimsrud, Tom – Mørkrid, Lars 2014. Stability of selected serum hormones and lipids after long-term storage in the Janus Serum Bank. *Clinical Biochemistry*. Article in press.

Grass, Josephine – Pabst, Martin – Chang, Martina – Wozny, Manfred – Altmann, Friedrich 2011. Analysis of recombinant human follicle-stimulating hor-

mone (FSH) by mass spectrometric approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400(8). 2427-2438.

Groome, NP – Illingworth, PJ – O'Brien, M – Pai, R – Rodger, FE – Mather, JP – McNeilly, AS 1996. Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 81. 1401-1405.

Halonen, Toivo 2004a. Fotometriset menetelmät. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. 1. painos. Helsinki: WSOY.

Halonen, Toivo 2004b. Immunokemiallisten menetelmien periaatteet. Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.): *Kliiniset laboratoriotutkimukset*. 1. painos. Helsinki: WSOY.

Halttunen-Nieminen, Mervi 2011. Kuukautiskierto. Teoksessa Ylikorkala, Olavi – Tapaninen, Juha (toim.): *Naistentaudit ja synnytykset*. 5. painos. Helsinki: Duodecim.

Heins, Michael – Heil, Wolfgang – Withold, Wolfgang 1995. Storage of serum of whole blood samples? Effect of time and temperature on 22 serum analytes. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 33. 231-238.

Hiltunen, Erkki – Linko, Linnèa – Hemminki, Sari – Hägg, Margareta – Järvenpää, Eila – Saarinen, Pertti – Simonen, Seppo – Kärhä, Petri (toim.) 2011. Laadukkaan mittaamisen perusteet. *Finas. Meteorologian neuvottelukunta. Verkkodokumentti*. <
http://www.mikes.fi/mikes/Oppaat/j4_2011_laadukkaan_mittaamisen_perusteet.pdf>. Luettu 27.10.2014.

Huhtaniemi, Ilpo – Tapanainen, Juha 2011. Munasarjan toiminta sukkukypsässä iässä ja sen jälkeen. Teoksessa Ylikorkala, Olavi – Tapaninen, Juha (toim.): *Naistentaudit ja synnytykset*. 5. painos. Helsinki: Duodecim.

Huslab 2014a. Estradioli, seerumista. Tutkimusohjekirja.

Huslab 2014b. Follikkelia stimuloiva hormoni, seerumista. Tutkimusohjekirja.

Jaarinen, Soili – Niiranen, Jukka 2005. Laboratorion analyysitekniikka. 5. painos. Helsinki: Edita.

KvantiMOTV 2014. Hajontaluvut. Verkkodokumentti <
<http://www.fsd.uta.fi/menetelmaopetus/hajontaluvut/hajontaluvut.html>>. Luettu 26.10.2014.

Kalra, Bhanu – Kumar, Ajay – Patel, Kinita – Patel, Amita – Khosravi MJ 2010. Development of a second generation Inhibin B ELISA. *Journal of Immunological Methods* 362 (1-2). 22-31.

Kokko, T – Kokko, L – Lövgren, T – Soukka, T 2007. Homogeneous noncompetitive immunoassay for 17 β -estradiol based on fluorescence resonance energy transfer. *Analytical Chemistry* 79(15). 5935-5940.

Kubasik, Norman – Ricotta, Margaret – Hunter, Teri – Sine, Harrison 1982. Effect of duration and temperature of storage on serum analyte stability: examination of 14 selected radioimmunoassay procedures. *Clinical Chemistry* 28(1). 164-165.

Murray, W – Peter, AT – Teclaw, RF. 1993. The clinical relevance of assay validation. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 15(12). 1665-1675.

Mäkelä, Riikka 2014. Näytteiden käsittely ja lähetys näytteenottolaboratoriossa. *Laboratoriolääketiede ja näyttely 2014*. Marina congress center, Helsinki 9.10.2014.

Nelson, Robert – Grebe, Stefan – O`Kane Dennis – Singh, Ravinder 2004. Liquid chromatography- tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of estradiol and estrone in human plasma. *Clinical Chemistry* 50(2). 373-384.

Pharmacelsus 2014. Intra Assay Variation. Verkkodokumentti <http://www.pharmacelsus.de/intra_assay_variation/>. Luettu 12.11.2014.

The Photochemistry Portal 2015. Avatar and Photochemistry: Chemiluminescence. Verkkodokumentti <<https://photochemistry.wordpress.com/tag/chemiluminescence/>>. Luettu 21.3.2015.

Qui, Quing – Kuo, Andy – Todd, Heather – Dias, James – Gould, John – Overstreet, James – Lasley, Bill 1998. Enzyme immunoassay method for total urinary follicle-stimulating hormone (FSH) beta subunit and its application for measurement of total urinary FSH. *Fertility and sterility* 69(2). 278-285.

Ray, Julie – Kushnir, Mark – Bunker, Ashley – Rockwood, Alan – Meikle, Wayne 2012. Direct measurement of free estradiol in human serum by equilibrium dialysis-liquid chromatography-tandem mass spectrometry and reference intervals of free estradiol in women. *Clinical Chimica Acta* 413(11-12). 1008-1014.

Salimetrics 2015. Inter- and intra-assay coefficients of variability. Verkkodokumentti <https://www.salimetrics.com/assets/documents/Spit_Tips_-_Inter__Intra_Assay_Coefficients_of_Variability.pdf> Luettu 8.1.2015.

Sand, Olav – Sjaastad, Øystein – Haug, Egil – Bjålie, Jan 2012. Ihminen, Fysiologia ja anatomia. 8.-9. painos. Helsinki: Sanoma Pro Oy.

Schiettecatte, Johan – Anckaert, Ellen – Smits, Johan 2012. Interferences in immunoassays. Teoksessa Chiu, Norman – Christopoulos, Theodore (toim.): *Advances in Immunoassay Technology*. 1. painos. Kroatia: InTech.

Scriver, Jessica – Baker, Valerie – Young, Steven – Behr, Barry – Pastore, Lisa 2010. Inter-laboratory validation of the measurement of follicle stimulating hormone (FSH) after various lengths of frozen storage. *Reproductive Biology and Endocrinology* 8. 145.

SERO 2015. Seronorm immunoassay. Verkkodokumentti. < http://www.sero.no/mainproducts/branded/immunochemistry/seronorm_immunoassay>. Luettu 8.1.2015

Siemens 2013a. Immulite 2000, Estradiol.

Siemens 2013b. Immulite 2000, FSH.

Siemens AG 2014a. Immulite 1000 Immunoassay System. Verkkodokumentti. < <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/systems/immulite-1000-immunoassay-system/assays>>. Luettu 18.9.2014.

Siemens AG 2014b. Immulite® 1000 Chemiluminescent Technology. Verkkodokumentti. < <http://www.healthcare.siemens.com/immunoassay/immulite-1000-chemiluminescent-technology>>. Luettu 18.9.2014.

Siemens 2010. Operator's Guide. Immulite 2000 systems.

Sigma-Aldrich 2014. Inhibin-B EIA KIT. Product information.

Silva, Carla – Lima, Diana – Schneider, Rudolf – Otero, Marta – Esteves, Valdemar 2013. Development of ELISA methodologies for the direct determination of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in complex aqueous matrices. *Journal of Environmental Management* 124(30). 121-127.

Soldina, Offie – Hoffmann, Eve – Waring, Michael – Soldina, Steven 2005. Pediatric reference intervals for FSH, LH, estradiol, T3, free T3, cortisol, and growth hormone on the DPC IMMULITE 1000. *Clinica Chimica Acta* 355 (1-2). 205–210.

Stenman, Ulf-håkan – Hämäläinen, Esa 2010. Hormonimäärityksiä häiritsevät tekijät. *Vaihdevuodet. Teoksessa Välimäki, Matti – Sane Timo – Dunkel Leo (toim.): Endokrinologia. x. painos. Paisassa: Duodecim.*

Taieb, Joëlle – Benattar, Clarisse – Birr, Anne Sophie – Lindenbaum, Albert – Frydman, René – Olivennes, François 2000. Delayed assessment of serum and whole blood estradiol, progesterone, follicle-stimulating hormone, and luteinizing hormone kept at room temperature or refrigerated. *Fertility and Sterility* 74(5). 1053-1054.

Tapola, Hilka 2004. Näytteiden käsittely ja lähettäminen sekä kuljetus. *Teoksessa Penttilä, Ilkka (toim.) Kliiniset laboratoriotutkimukset. 1. painos. Helsinki: WSOY.*

Tiitinen, Aila 2010. Vaihdevuodet. *Teoksessa Välimäki, Matti – Sane Timo – Dunkel Leo (toim.): Endokrinologia. 2. painos. Helsinki: Duodecim.*

Tuokko, Seija 2010. Näytteiden esikäsittely ja säilytys. *Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Laboratoriolääketiede - kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.*

Xin, Tian-Bing – Liang, Shu-Xuan – Wang, Xu – Li, Haifang – Lin, Jin-Ming 2008. Determination of estradiol in human serum using magnetic particles-

based chemiluminescence immunoassay. Analytical Chimica Acta 627(2). 277-284.

Åkerman, Kari 2010. Immunokemialliset analysointimet. Teoksessa Niemelä, Onni – Pulkki, Kari (toim.): Laboratoriolääketiede - kliininen kemia ja hematologia. 3. painos. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

